

AN 1986:39702 CAPLUS

DN 104:39702

TI Manufacture of an antitumor substance from cartilage

IN Suzuki, Fujio; Kato, Yukio; Kai, Yuji; Takigawa, Masaharu; Shiio, Takeshi

PA Ajinomoto Co., Inc., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

FAN.CNT 1

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI JP 60178820	A2	19850912	JP 1984-32199	19840222 <--
JP 05073760	B4	19931015		

AB Animal \*\*\*cartilage\*\*\* was \*\*\*extd\*\*\* with an aq. solvent, and the \*\*\*ext\*\*\* was treated with a hydrophilic \*\*\*org\*\*\*. \*\*\*solvent\*\*\* to give a ppt. with mol. wt. of 10 times. 105 - 30 times. 105 and with vascular epithelial cell growth inhibition activity. The antitumor protein-like substance is sepd. by chromatog. on diethylamino agarose by using 0.25-0.6M NaCl as eluent. Thus, 350 g cartilage from calf fetuses was homogenized with 1M guanidine-HCl-0.1M 6-amino-n-caproic acid (pH 6.0) and the homogenate was centrifuged at 8000 rpm for 20 min to give a supernatant, which was subjected to 65% Me2CO fractionation. After centrifugation, the ppt. was dissolved in distd. H2O, dialyzed and freeze-dried to obtain a product, which was dissolved in 4M guanidine-HCl-0.01 M EDTA-0.1M 6-amino-n-caproic acid (pH 6.5), subjected to ultrafiltration on XM-300 membrane and Spectrofilter UF(A) membrane, dialyzed and freeze-dried. The resultant product dissolved in 10 mM Na phosphate buffer (pH 8.0) was chromatographed on DEAE-Sepharose CL-6B (gradient elution 0-0.6M NaCl) to give an active fraction with vascular epithelial cell growth inhibition activity (6400 units/mg protein). The antitumor activity of the prepn. was demonstrated in mice.

**WEST**[Help](#)[Logout](#)[Main Menu](#)[Search Form](#)[Result Set](#)[Show S Numbers](#)[Edit S Numbers](#)[First Hit](#)[Previous Document](#)[Next Document](#)[Full](#)[Title](#)[Citation](#)[Front](#)[Review](#)[Classification](#)[Date](#)[Reference](#)[Claims](#)[KWC](#)**Document Number 12**

PAT-NO: JP360178820A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 60178820 A

TITLE: PREPARATION OF ANTITUMOR ACTIVE SUBSTANCE

PUBN-DATE: September 12, 1985

**INVENTOR-INFORMATION:**

NAME

SUZUKI, FUJIO

KATO, YUKIO

KAI, YUJI

TAKIGAWA, MASAHARU

SHIIO, TAKESHI

**ASSIGNEE-INFORMATION:**

NAME

AJINOMOTO CO INC

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP59032199

APPL-DATE: February 22, 1984

INT-CL (IPC): A61K 35/32; A61K 37/02

**ABSTRACT:**

PURPOSE: To obtain the titled substance, by extracting an animal cartilage with an aqueous solvent, precipitating it with a hydrophilic solvent, separating a specific fraction.

CONSTITUTION: An animal cartilage such as cartilage of bovine fetus, etc. is sliced, homogenized with an aqueous solvent (e.g., aqueous solution of salt, etc.), and fractionated with acetone (45%~65wt% precipitated). The prepared precipitate is redissolved in the aqueous solution of salt, and separated by membrane fractionation (100,000~300,000 molecular weight). A substance having inhibitory activity against multiplication of endothelial cell of blood vessel is separated from it. Or, it is further adsorbed on diethylaminoethyl agarose (7%~9pH), and eluted with a saline solution (0.25%~0.6M). The substance is optionally purified by a protein purifying means such as dialysis, etc., lyophilized and can be preserved.

EFFECT: An animal cartilage having low side effect owing to derivation from organism, obtainable in a large amount, is used as a starting raw material.

COPYRIGHT: (C)1985,JPO&amp;Japio

[Main Menu](#)[Search Form](#)[Result Set](#)[Show S Numbers](#)[Edit S Numbers](#)[First Hit](#)[Previous Document](#)[Next Document](#)[Full](#)[Title](#)[Citation](#)[Front](#)[Review](#)[Classification](#)[Date](#)[Reference](#)[Claims](#)[KWC](#)[Help](#)[Logout](#)

**WEST**[Help](#)[Logout](#)

<a href="#">Main Menu</a>	<a href="#">Search Form</a>	<a href="#">Result Set</a>	<a href="#">Show S Numbers</a>	<a href="#">Edit S Numbers</a>
---------------------------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	--------------------------------

[First Hit](#)[Previous Document](#)[Next Document](#)

<a href="#">Full</a>	<a href="#">Title</a>	<a href="#">Citation</a>	<a href="#">Front</a>	<a href="#">Review</a>	<a href="#">Classification</a>	<a href="#">Date</a>	<a href="#">Reference</a>	<a href="#">Claims</a>	<a href="#">KWC</a>
----------------------	-----------------------	--------------------------	-----------------------	------------------------	--------------------------------	----------------------	---------------------------	------------------------	---------------------

**Document Number 33**

Entry 33 of 53

File: DWPI

Sep 12, 1985

DERWENT-ACC-NO: 1985-266692

DERWENT-WEEK: 198543

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Extraction of antitumour substances from mammalian cartilage - using aq. soln. of hydrophilic solvent

PATENT-ASSIGNEE: AJINOMOTO KK[AJIN]

PRIORITY-DATA: 1984JP-0032199 (February 22, 1984)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 60178820 A	September 12, 1985	N/A	006	N/A
JP 93073760 B	October 15, 1993	N/A	005	C07K 015/06

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP60178820A	N/A	1984JP-0032199	February 22, 1984
JP93073760B	N/A	1984JP-0032199	February 22, 1984
JP93073760B	Based on	JP60178820	N/A

INT-CL (IPC): A61K 35/32; A61K 37/02; C07K 15/06

ABSTRACTED-PUB-NO: JP60178820A

BASIC-ABSTRACT: The extraction method of anti-tumour substances consists of extraction with aq. solvent. The anti-cancer substance obtd. is characterized by (a) having inhibitory activity against vessel endothelium increase, (b) mol. wt. of 100-300 thousands, (c) being adsorbed on diethylaminoethyl agarose, and (d) being eluted with 0.25-0.6M NaCl soln..

USE/ADVANTAGE - Only the fraction of the extract of mol. wt. 100-300 thousands shows anti-tumour activity and inhibitory activity against vessel endothelium increase. Suitable cartilage as extraction material is embryo cartilage, esp. bovine embryo cartilage. It is not clear whether the anti-tumour substance and the inhibitory activity component against vessel endothelium increase are the same or different, but they exist in the same fraction. The anti-tumor substance can be purified by membrane fractionation adsorption on diethylaminoethyl agarose, dialysis etc.. It has reduced side effects, is easily prepared and can be administrated as an oral or injectable compsn..

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: B04

CPI-CODES: B04-B04E; B12-G07;

<a href="#">Main Menu</a>	<a href="#">Search Form</a>	<a href="#">Result Set</a>	<a href="#">Show S Numbers</a>	<a href="#">Edit S Numbers</a>
---------------------------	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	--------------------------------

[First Hit](#)[Previous Document](#)[Next Document](#)

<a href="#">Full</a>	<a href="#">Title</a>	<a href="#">Citation</a>	<a href="#">Front</a>	<a href="#">Review</a>	<a href="#">Classification</a>	<a href="#">Date</a>	<a href="#">Reference</a>	<a href="#">Claims</a>	<a href="#">KWC</a>
----------------------	-----------------------	--------------------------	-----------------------	------------------------	--------------------------------	----------------------	---------------------------	------------------------	---------------------

[Help](#)[Logout](#)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-178820

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 35/32  
37/02

識別記号

ADU

庁内整理番号

7138-4C  
7138-4C

⑭ 公開 昭和60年(1985)9月12日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 抗腫瘍活性物質の製造方法

⑯ 特 願 昭59-32199

⑰ 出 願 昭59(1984)2月22日

⑱ 発 明 者	鈴 木	不 二 男	豊中市中桜塚2-13-11
⑱ 発 明 者	加 藤	幸 夫	枚方市禁野本町2-11-2752
⑱ 発 明 者	開	祐 司	八尾市八尾木22-1
⑱ 発 明 者	滝 川	正 春	大阪市阿倍野区晴明通9-7
⑱ 発 明 者	椎 尾	剛	鎌倉市山崎1495-5
⑰ 出 願 人	味の素株式会社		東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

抗腫瘍活性物質の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. 動物軟骨より、水性溶媒で抽出した後、親水性有機溶媒で沈澱せしめ、血管内皮細胞増殖阻害活性を有する限外通過法で測定したときに分子が10～30万の画分を分離することを特徴とする抗腫瘍活性物質の製造方法。

2. 抗腫瘍活性物質が、ジエチルアミノエチルアガロースに吸着し0.25～0.6M食塩水で溶離できるものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は抗腫瘍活性物質の新規製造方法に関する。

本発明者は、軟骨組織よりの粗抽出物はそのままでは抗腫瘍活性を示さないが、水性溶媒で抽出した後、親水性有機溶媒で沈澱せしめ血管内皮細胞増殖阻害活性を有する分子量10～30万の画

分を分離したところこれが抗腫瘍活性を示すことを見出し、この発見に基づいて本発明を完成するに至った。すなわち、この物質は、上記粗抽出物よりソマトメジン様成長因子CDF(Cartilage-Derived Factor)を分離した残渣より抽出精製されたものである。

本発明の出発物質として使用する動物軟骨は多量に入手できるという点で胎児軟骨、特に牛胎児軟骨が好ましい。

本発明の目的物質は水に可溶、親水性有機溶媒に難溶であるが、出発物質より抽出するには、グアニジン等塩水溶液でpH5～7程度の塩溶液に溶解し、これにアセトン、エタノール等の親水性有機溶媒を加えて再沈せしめ分取すればよい。

分子量10～30万の画分を分離するには例えば膜分画法を採用すればよい。

血管内皮細胞増殖阻害活性の測定は公知の測定手段を利用すればよいが、本発明では後述の方法により行った。

なお、血管内皮細胞増殖阻害活性成分と抗腫瘍

本発明で得られた物質を制御剤として使用する場合には、そのまゝあるいは適当な担体とともに経口投与するか、生理食塩水に溶解して注射投与することが考えられる。

本発明品は、生体由来であるため副作用が少なく、大量に入手可能な動物軟骨を出発原料として、必要によりさらに精製して制御剤としての実用性が期待される。

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

#### 実施例

##### 血管内皮細胞増殖阻害活性の測定

血管内皮細胞、例えば牛肺動脈内皮細胞を通常のの方法、例えば直径6mm、9.6穴のマルチ培養プレートに1穴当り $5 \times 10^3$ 個細胞を0.1mlの20%牛胎児血清含有最少必須培養液(Minimum Essential Medium)中に懸濁し、播種し、5%炭酸ガス通気下37℃で培養した。培養3日後培地交換を行ない、試料溶液(試料を平衡塩溶液に溶解したもの)又は試料の溶液に用いた前記平衡塩溶液(対照)を添加し、これより22時間後、

活性成分が同一かどうか確認できていないが、上記処理手段により得られ、かつ血管内皮細胞増殖阻害活性を有する成分、例えば被添試料F<sub>10</sub>が抗腫瘍活性を有するものとして本発明の目的物質となる。

具体的には例えば、牛胎児軟骨をスライスし水性懸液例えば塩水溶液中でホモジナイズし、7セプトン画(45~65%程度沈降)し、得られた沈降を上記塩水溶液中に再溶解し、膜分画(分子量10~30万)により分離すればよいが、さらにこれにより血管内皮細胞増殖阻害活性を有する物質を分離することもできる。

又は、さらにジエチルアミノエチル(DEAE)フクロースに吸着させ(pH7~9)た後、食塩水(0.25~0.6M)で溶離すればよい。所望に上記析出等常法の蛋白精製手段により精製し凍結乾燥し保存することができ。

このようにして得られた凍結乾燥品は灰白色の粉末で、水に可溶である。水溶液のpH値は6~7である。

3H-チミジン(終濃度1μCi/ml)添加し、さらに2時間後DNA画分へとり込まれた<sup>3</sup>H放射能を計測し、「DNA合成」とする。試料および対照のDNA合成値より、下記式により試料の阻害率を求める。例を第1図に示した。

$$\text{DNA合成阻害率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{試料のDNA合成}}{\text{対照のDNA合成}}\right) \times 100$$

○：試料F      △：試料P

1mlの培地に添加したとき阻害率50%を示すような試料を活性1単位とする。

又、培養プレート径を16mmとし、1穴当たり

$2 \times 10^4$ 個細胞を播種し、1日後きに培地交換を行ない同様に1~2週間培養したときの増殖細胞数に及ぼす。試料D(被添)の阻害作用を第2図に示した。

●：試料D 200μg/ml(終濃度)添加

○：対照

#### 実施例

(1) 牛胎児軟骨200gをスライスし、1M酢酸緩衝液-0.1M6-アミノ- $\alpha$ -カルプロン

試料A3gを4M酢酸緩衝液、0.01Mエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.1M6-アミノ- $\alpha$ -カルプロン(pH6.5)200mlに溶解し、8000rpm20分(4℃)遠心し、得られた上清を、1.0kg/cm<sup>2</sup>加圧下、アミコン社製分子量30万カット限外濾過膜「XM-300」を通し、限外濾過液を得た。さらに、2.0kg/cm<sup>2</sup>加圧下、東洋濾紙社製分子量2万カット限外濾過膜「UP20」を通して内液(分子量30万~2万画分)(試料B)

を測定したところ、試料Cにのみ活性が認められ

表 1

試料	n	I. R.
A	7	- 2.5%
B	7	56.0% <sup>*1</sup>

\* 1 腫瘍体積について対照群 (n = 7) に対して P < 0.01

長径より腫瘍体積を測定し次の式により腫瘍阻止率 (I. R.) を求め、結果を表 1 に示した。

$$I. R. = \frac{[\text{対照群の腫瘍体積}] - [\text{試料投与群の腫瘍体積}]}{[\text{対照群の腫瘍体積}]} \times 100\%$$

表 1 に示すように試料 A は抗腫瘍活性を示さな

かったのに対して、これより精製した試料 B は抗

腫瘍活性を示した。

一方、試料 B および C についてソマトニン活

性 (Y. Kato, Y. Nomura, M. Tani, H. Ohmura, M. Kinoshita,

S. Hamamoto and F. Suzuki "Cartilage-Derived

Factor (CDF) II.

Somatomedin-Like Action on Cultured chondrocytes "

Exp Cell Res. vol. 132 P 339-347 (1981) )

(2) 牛胎児軟骨 1.50 g 1 M グリツニソ塩酸 0.1 M 6-アミノ-ノ-カゾロニ酸 (pH 6.0) 1.5 g 中でミキサーにリホモゲナイズした。4℃下 48 時間攪拌の後 8000 rpm, 20 分 (4℃) 遠心し得られた上清にアセトンを経過度 4.5% 加し、0℃下 20 分放置した。次いで 8000 rpm 20 分 (4℃) 遠心し得られた上清にさらにアセトンを加え、乾燥度 6.5% とし 0℃下 20 分放置した。8000 rpm 20 分 (4℃) 遠心後、得られた沈殿を 50 ml の蒸留水に溶解し蒸留水に対して 4℃下 48 時間透析の後凍結乾燥した。これを

200 ml の 4 M グリツニソ塩酸、0.01 M EDTA,

0.1 M 6-アミノ-ノ-カゾロニ酸 (pH 6.5) に

溶解し、1.0 kg/cm<sup>2</sup> 加圧下、限外濾過膜 (UM-300)

に通し、得られた限外濾過液を 1.5 kg/cm<sup>2</sup> 加圧下、

限外濾過膜 (UP 20) に通し、内液を採取し同様

蒸留水に対して凍結乾燥し、172 mg の

粉末 (試料 D) を得た。蛋白を重量比で 6.4.5%

(ノオニン法) 含有する。

ICR 雌マウス (5 週令) の皮下にサルマ-

180 腫瘍細胞を移植し、担荷とした後、試料 D

2 mg を生理食塩水に溶解したものおよび対照群と

して、生理食塩水のみを 4 回皮下投与し、腫瘍移

植後 5 週間目の腫瘍体積を測定し腫瘍阻止率を求

め、結果を表 2 に示した。

表 2

試料	n	I. R.	完全溶解
D	7	77% <sup>*2</sup>	3/7

\* 2: 腫瘍体積について対照群 (n = 7)

に対して P < 0.01

限外濾過液を 1.5 kg/cm<sup>2</sup> 加圧下、限外濾過膜 (UP 20) に通し、内液を採取し、さらにこれを 1 kg/cm<sup>2</sup> 加圧下、限外濾過膜 (UM-300) に通し、得られた

ノ-ノ-カゾロニ酸 (pH 6.5) に溶解し 1.0 kg/cm<sup>2</sup> 加圧下、限外濾過膜 (UM-300) に通し、得られた

表 2 より試料 D は著しい抗腫瘍活性を示し、その結果、7 匹中 3 匹は腫瘍が完全に退縮していることが理解される。

対して透析の後凍結乾燥し270mgの試料Eを取得し、これを10mM磷酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)30mlに溶解し、不溶物を遠心除去し試料Fを得た(蛋白138mg)。これを「DEAEセフアロースCL-6B」(DEAEアガロース;ファルマシア社製)カラム(径1.5cm×13cm, 23ml)(10mM磷酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)に平衡化した)に通流し、次いで上記同一緩衝液0~0.6M塩化ナトリウムを含有した溶液でグラジエント溶出し、溶離液を分画採取した(1分画13ml)。

溶離パターン(280nm吸光度、血管内皮細胞増殖阻害活性)を第3図に示した。分画番号19~21(塩化ナトリウム0.26~0.33M溶離分画)に血管内皮細胞増殖阻害活性を回収した(活性回収率103%、比活性6400単位/mg蛋白、×70.4倍精製)。これを試料Gとした。

C57BL雄マウスの足底にB16メラノーマ腫瘍細胞(3×10<sup>5</sup>個)を移植し、担瘤とした後、試料E(0.5mg)を生理食塩水に溶解したもの、および対照群として、生理食塩水のみを6回皮下

投与し、腫瘍移植後6週間目の腫瘍体積を測定し腫瘍阻止率を求め、結果を表3に示した。

表 3

試料	n	I. R.
E	7	66% <sup>*3</sup>

\*3: 腫瘍体積において対照群(n=7)に対してP<0.01

表3より試料Eは著しい抗腫瘍活性を示していることが理解される。

C57BL雄マウスの足底にB16メラノーマ腫瘍細胞(3×10<sup>5</sup>個)を移植し、担瘤とした後、試料F230μg蛋白を生理食塩水に溶解したもの、および試料G10μg蛋白を生理食塩水に溶解したもの、および対照群として、生理食塩水のみを6回皮下投与し、腫瘍移植後2.5週間目の腫瘍体積を測定し腫瘍阻止率を求め、結果を表4に示した。

表 4

試料	n	I. R.
F	7	48%
G	7	74% <sup>*4</sup>

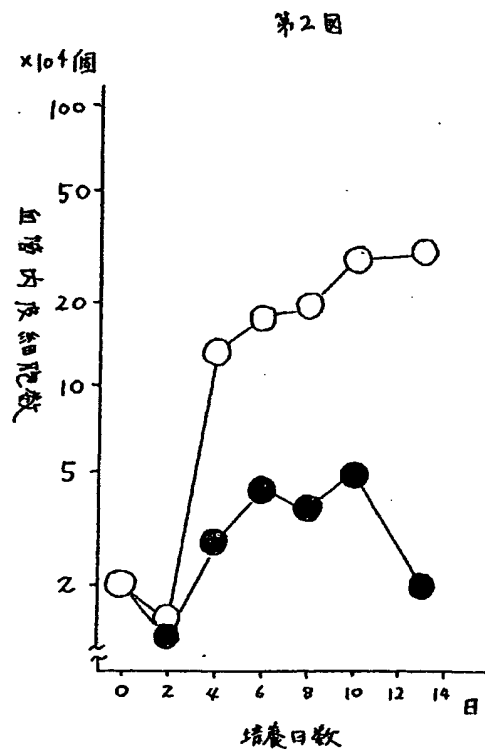
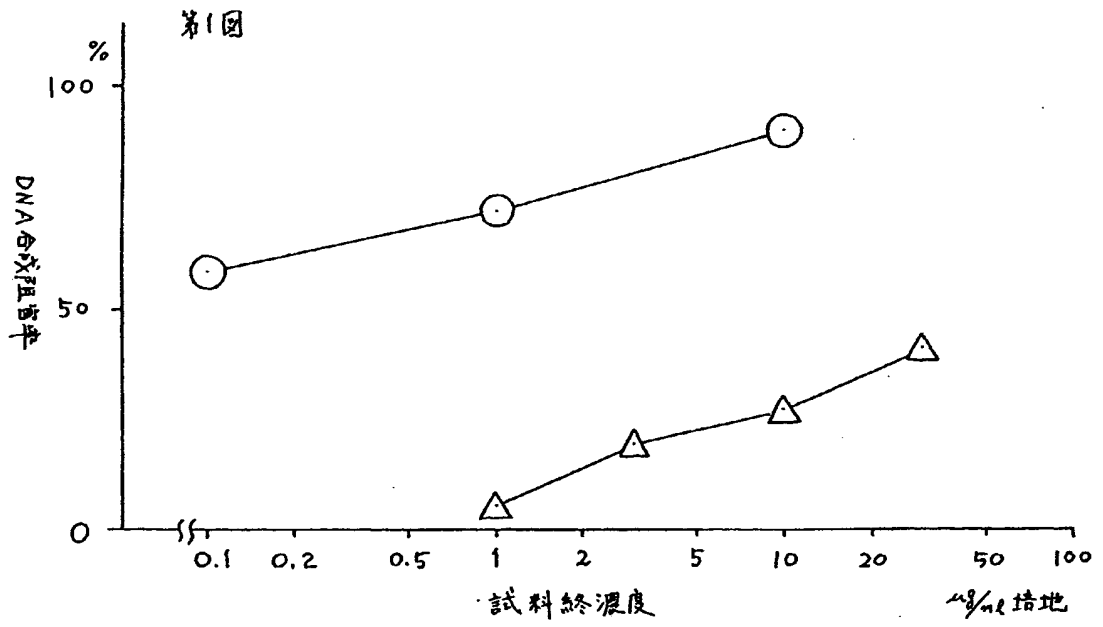
\*4: 腫瘍体積において対照群(n=5)に対してP<0.01

表4より、試料F、Gは著しい抗腫瘍活性を示していることが理解される。

なお試料F、Gの1回投与量中の血管内皮細胞増殖阻害活性は、各々21単位、65単位であった。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はDNA合成阻害率測定例を、第2図は試料Dの血管内皮細胞増殖阻害活性作用を、第3図はDEAEアガロースカラム溶離パターン(280nm吸光度、血管内皮細胞増殖阻害活性)を示す。





第3圖

